

P

L12 ANSWER 3 OF 4 CA COPYRIGHT 2003 ACS

AN 131:254652 CA

TI Reagent constituents for measuring chloride ion by enzymic analysis

IN Kimata, Shinsuke; Asano, Shigeki; Kawamura, Yoshihisa

PA Toyobo Co., Ltd., Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 7 pp.

CODEN: JKXXAF

DT Patent

LA Japanese

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 11266898	A2	19991005	JP 1998-77677	19980325
PRAI	JP 1998-77677		19980325		

OS MARPAT 131:254652

AB Reagent constituents are provided for accurately measuring chloride ion with an adequate sensitivity by enzymic anal. without using coupled enzymes. The reagent contains (a) inactive-type .alpha.-amylase, (b) a chelating agent, and (c) a maltooligosaccharide deriv. as a substrate, I (R1 and R2= .beta.-galactopyranosyl group or H; R3= 2-chloro-4-nitrophenol group; n= 0-2). A significantly higher sensitivity was obtained in measuring chloride ion by using 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O-.beta.-D-galactopyranosyl-.alpha.-maltoside or 2-chloro-4-nitrophenyl-.alpha.-maltotrioxide as a substrate in comparison with 4-nitrophenyl-.alpha.-maltotrioxide.

IC ICM C12Q001-40

ICS G01N033-84

CC 9-2 (Biochemical Methods)

Section cross-reference(s): 7

ST chloride enzymic analysis reagent amylase maltooligosaccharide

IT Maltooligosaccharides

RL: ARG (Analytical reagent use); ARU (Analytical role, unclassified); ANST (Analytical study); USES (Uses)
(deriv.; reagent constituents for measuring chloride ion by enzymic anal.)

IT Analysis

(enzymic anal.; reagent constituents for measuring chloride ion by enzymic anal.)

IT Blood analysis

Chelating agents

Urine analysis

(reagent constituents for measuring chloride ion by enzymic anal.)

IT Reagents

RL: ARG (Analytical reagent use); ANST (Analytical study); USES (Uses)
(reagent constituents for measuring chloride ion by enzymic anal.)

IT 9000-90-2, Amylase, .alpha.-

RL: ARG (Analytical reagent use); ANST (Analytical study); USES (Uses)
(inactive-type; reagent constituents for measuring chloride ion by enzymic anal.)

IT 16887-00-6, Chloride, analysis

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)
(reagent constituents for measuring chloride ion by enzymic anal.)

IT 118291-90-0, 2-Chloro-4-nitrophenyl-.alpha.-maltotrioxide

157381-11-8

RL: ARG (Analytical reagent use); ANST (Analytical study); USES (Uses)
(reagent constituents for measuring chloride ion by enzymic anal.)

IT 60-00-4, EDTA, analysis 69-79-4, Maltose 1109-28-0D, Maltotriose, derivs. 10016-20-3, .alpha.-Cyclodextrin

RL: ARU (Analytical role, unclassified); ANST (Analytical study)
(reagent constituents for measuring chloride ion by enzymic anal.)

=>

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-266898

(43)公開日 平成11年(1999)10月5日

(51)IntCl⁶

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/40

C 1 2 Q 1/40

G 0 1 N 33/84

G 0 1 N 33/84

Z

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平10-77677

(22)出願日 平成10年(1998)3月25日

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 木全 伸介

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 浅野 茂樹

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

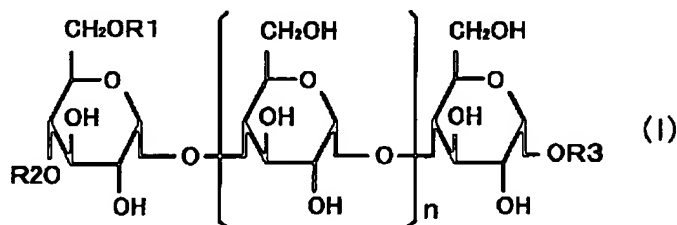
(54)【発明の名称】 塩素イオン測定用試薬組成物

(57)【要約】

【課題】 追隨酵素を使用することなく、十分な感度を有し、かつ、測定精度が高い塩素イオン測定用試薬組成物を提供する。

【解決手段】 (a) 不活性化型 α -アミラーゼ、(b) キレート剤および(c) 基質として、一般式(I)

【化1】



(式中R1およびR2は β -ガラクトピラノシル基または水素原子のいずれかを示し、R3は2-クロロ-4-ニトロフェノール基を示し、nは0~2の整数を示す。)

す。)で表されるマルトオリゴ糖誘導体を含む、追隨酵素を含有しない塩素イオン測定用試薬組成物。

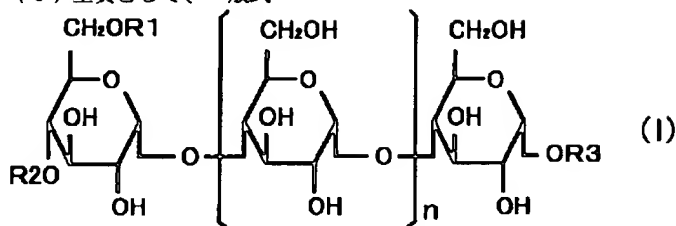
【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 不活性化型 α -アミラーゼ、

(b) キレート剤および(c) 基質として、一般式 *

* (I)

【化1】



(式中R1およびR2は β -ガラクトピラノシル基または水素原子のいずれかを示し、R3は2-クロロ-4-ニトロフェニル基を示し、nは0~2の整数を示す。)で表されるマルトオリゴ糖誘導体を含むし、追隨酵素を含有しない塩素イオン測定用試薬組成物。

【請求項2】 マルトオリゴ糖誘導体が、2-クロロ-4-ニトロフェニル4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシドである請求項1記載の塩素イオン測定用試薬組成物。

【請求項3】 マルトオリゴ糖誘導体が、2-クロロ-4-ニトロフェニル- α -マルトシドである請求項1記載の塩素イオン測定用試薬組成物。

【請求項4】 さらに、マルトオリゴ糖またはその還元末端グルコースに非発色基が結合したマルトオリゴ糖を含む請求項1記載の塩素イオン測定用試薬組成物。

【請求項5】 マルトオリゴ糖がマルトース、マルトリオシドまたは α -シクロデキストリンである請求項4記載の塩素イオン測定用試薬組成物。

【請求項6】 試薬組成物の最終pHが、5.5~7.5に保持されている請求項1~5記載の塩素イオン測定用試薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 α -アミラーゼ活性を利用する塩素イオン測定用試薬組成物に関する。更に詳しくは、液体、特に血液または尿中の塩素イオンの測定用試薬組成物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】血清中の塩素イオン量の測定は、低クロール血症として、低張性脱水症、グルココルチコイド過剰症、呼吸性アシドーシス等の疾患、高クロール血症としては、高張性脱水症、尿管管性アシドーシス、呼吸性アルカローシス等の疾患の診断に用いられる。

※【0003】 α -アミラーゼ活性を利用した塩素イオン測定方法としては、非活性化型 α -アミラーゼ、カルシウム錯体および α -アミラーゼ測定試薬からなる測定方法が公知である(特開昭63-126497号公報)。この方法では、カルシウム錯体を添加することや、一般的に α -アミラーゼ測定試薬中に含まれる、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ等の追隨酵素の影響で、マルトオリゴ糖誘導体が分解されることにより、試薬ブランクの上昇が著しく大きく、測定値の精度が悪いといった問題点があった。

【0004】一方、この問題点を解決した方法として、基質として、4-ニトロフェニル- α -D-マルトリオシド、4-ニトロフェニル- α -D-マルトテトラオシド等を用いる、追隨酵素を用いない測定方法が、知られている(特開平4-94698号公報)。しかし、この方法では十分な感度が得られず、測定値の精度が悪いという問題が依然として顕在し、実使用に耐えうるものではない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記のような問題を解決するものであり、精密性、定量性、正確性に優れた塩素イオン測定用組成物を提供することにある。

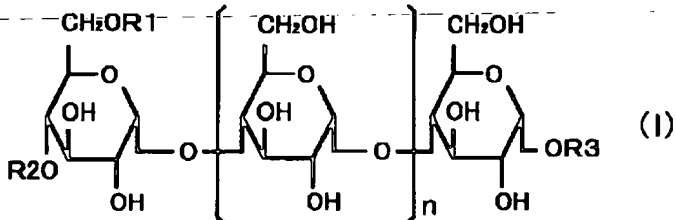
【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討したところ、基質として、一般式(I)で示されるマルトオリゴ糖誘導体を使用することにより、上記課題を解決し、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は、(a) 不活性化型 α -アミラーゼ、(b) キレート剤、および(c) 基質として、一般式(I)

【0008】

【化2】



【0009】(式中、R1およびR2は β -ガラクトピラノシル基、または水素原子を示し、R3は2-クロロ-4-ニトロフェノール基を示し、nは0~2の整数を示す。)で表されるマルトオリゴ糖誘導体含有し、追随酵素を含有しない塩素イオン測定用試薬組成物である。

【0010】

【発明の実施の態様】本発明の塩素イオン測定用試薬組成物は、 α -アミラーゼの活性化剤である塩素イオンにより、 α -アミラーゼが活性化されることを利用し、分解された2-クロロ-4-ニトロフェノールを測定することにより、試料中の塩素イオンの量を測定するものであり、その一実施形態としては、試料中の塩素イオンに不活性化型 α -アミラーゼ、キレート剤、基質として、例えば、2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシドを作用させ、遊離する2-クロロ-4-ニトロフェノールを測定し、試料中の塩素イオン量を知るものである。

【0011】本発明で使用する α -アミラーゼとは、微生物、植物、または動物のいずれの起源のものも用いることができるが、好適には動物起源のものであり、たとえば、ブタ膵由来の α -アミラーゼが例示される。しかしながら、本発明に用いられる α -アミラーゼは脱塩されて、不活性化型である必要がある。不活性化型 α -アミラーゼは、前述のように試料中の塩素イオンを得て、活性化型 α -アミラーゼとなり、 α -アミラーゼの基質と反応する。脱塩方法としては、透析、限外濾過、イオン交換、カラム除去などの方法がある。不活性化型 α -アミラーゼの試薬組成中の濃度は、好ましくは0.5~1000 IU/mlの範囲で用いられる。

【0012】本発明のキレート剤とは、エチレンジアミン四酢酸およびその塩、グリコールエーテルジアミン四酢酸、1,2-ビス(o-アミノフェノキシ)エタン四酢酸、トランス-1,2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸等があげられる。キレート剤の塩素イオン測定試薬組成中での役割としては、ブランク反応をおさえる、または測定対象外の類似共雑イオンをマスキングする等があげられる。その濃度は、0.01~10mMで好適に用いられる。またこれらのキレート剤は複数組み合わせ用いても良い。

【0013】本発明の基質は、上記一般式(1)(式中R1およびR2は β -ガラクトピラノシル基、または水素のいずれかを示し、R3は2-クロロ-4-ニトロフェノール基を示し、nは0~2の整数を示す。)に示されるものである。その例として、2-クロロ-4-ニトロフェニル- α -マルトトリオシド、2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシド等がある。特に、2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシドは、非還元末端が修飾されていることから、

内因性 α -グルコシダーゼ等による基質分解によって生じる試薬ブランクの上昇がない、 α -アミラーゼの基質親和性がより高いため、好感度であるといったメリットがあることから好適に用いられる。該基質の試薬組成中での濃度は、0.1~50mMで好適に用いられる。

【0014】また、本発明の測定試薬組成物には、試薬ブランクをおさえ、感度を調節し、定量性、定量域を向上させ、管理血清等に含まれる試料中のマルトース等の影響を回避する等の目的のため、必要により、マルトオリゴ糖、またはその還元末端グルコースに非発色源基が結合したマルトオリゴ糖からなる群から選ばれる α -アミラーゼの基質を競合させ、主反応基質に対する見かけの親和性を低下させることができる。ここで用いられるマルトオリゴ糖としては、例えば、マルトース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどのグルコース数が2~7のマルトオリゴ糖があげられる。還元末端グルコースに非発色源基が結合したマルトオリゴ糖としては、例えば、2,4-ジクロロフェニル- α -D-マルトトリオシド、2,4-ジクロロフェニル- α -D-マルトトリオシドなどがあげられる。これらのマルトオリゴ糖、またはその還元末端グルコースに非発色源基が結合したマルトオリゴ糖を用いる濃度としては、試薬組成中で1~250mMで好適に用いられる。

【0015】本発明の試薬組成物の最終pHは、5.5~7.5の範囲であり、より一層、 α -アミラーゼの糖分解反応速度そのものを制御し、測定範囲を広げることが可能となる。一方、 α -アミラーゼの安定した最適pHは、中性付近であることより、本発明の試薬組成物をpH6~8の範囲で調製するのが好ましいと考えられるが、同時に定量性等の性能を同時に得るには、最終pHを調製する試薬をさらに処方し、第一試薬と第二試薬に分け、それらが混合した状態で、反応最適pHになるように処方することもできる。

【0016】試薬pHを保持する方法は公知の方法であれば、何ら限定されるものではないが、一般的には緩衝剤が用いられる。用いる緩衝剤としては、例えば、グッド緩衝剤、トリス緩衝剤、リン酸緩衝剤等があげられる。緩衝剤は10~500mMの濃度で好適に用いられる。

【0017】これら塩素イオンに対する広範囲の定量性を得る方法としては、前述した(1)マルトオリゴ糖の添加、(2)試薬pHの調節などがあるが、これらを単独あるいは組み合わせ用いることができる。

【0018】さらに、本発明の測定用試薬組成物には、測定する塩素イオンの定量性に影響を及ぼさない範囲で、必要に応じて、防腐剤、界面活性剤等を使用することもできる。防腐剤としては、特に限定されないが、 α -アミラーゼの安定性に対する影響の少ない、アジ化ナ

トリウム、または、セフェム系、ペニシリン系、アミノグリコシド系、キノロン系等の抗生物質等が好適に用いられ、これらを単独あるいは組み合わせて使用することができる。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤などを単独あるいは組み合わせて使用することができる。また、2価カチオン、例えば、カルシウム、マグネシウム、バリウム、亜鉛等を0.01~200mMの濃度で添加することができる。また、必要に応じて、感度の向上を目的としたニトロフェノール類の解離促進剤を使用することができる。ニトロフェノール類の解離促進剤としては、例

例えば、 α -、 β -、 γ -シクロデキストリン等があげられ、0.1~20mMの濃度で添加することができる。【0019】本発明の試薬組成物は、酵素試液、基質試液の2液に分けてもよい。酵素試液には、不活性化型 α -アミラーゼおよびキレート剤を含み、基質試液には、上記一般式(1)で示される基質およびキレート剤を含む、組み合わせが好ましい。

【0020】本発明では、不活性化型 α -アミラーゼが、前述のように試料中の塩素イオンを得て、活性化型 α -アミラーゼとなり、 α -アミラーゼの基質と反応することを利用する。例えば、試料中の塩素イオンに不活性化型 α -アミラーゼ、キレート剤、基質として、2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシドを作用させることで、塩素イオン量に依存して活性化された α -アミラーゼの反応により、2-クロロ-4-ニトロフェノールを生成する。2-クロロ-4-ニトロフェノールが、それ自体400nm付近に吸収があることから、遊離後、400nm付近の吸光度の変化を測定し、既知濃度の試料の吸光*30

*度を対照に、試料中のカルシウムの濃度を求める。2-クロロ-4-ニトロフェノールの測定方法としては、アミラーゼの反応を連続的に追跡するレート法および一定時間反応させた後、反応を止めて測定するエンドポイント法のいずれもが使用される。

【0021】従来から公知である基質、4-ニトロフェニル- α -D-マルトトリオシド、4-ニトロフェニル- α -D-マルトテトラオシド等を用いる追跡酵素を用いない測定方法に比べて、本発明では、高感度であることから、測定精度が向上し、さらにマルトオリゴ糖等による妨害物質に対する影響を回避することが可能である(比較例1参照)。

【0022】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものでない。

実施例1

下記の酵素試液および基質試液の両試液のpHを5.5~7.5の範囲で変えて、塩素イオン測定用試薬を調製し、精製水、塩化ナトリウム100mM標準液を試料とした。試料5.8 μ lに酵素試液180 μ l加え、5分間予備加温した後、さらに、基質試液90 μ lを加えて、反応を開始させ、該基質試液添加後、2分後から3分間における1分あたりの吸光度変化を求め、塩素イオン100mMの感度(mABS/min)を求めた。その結果を図1に示す。

【0023】なお、測定装置は日立7170形自動分析装置を使用し、測定波長は、主波長405nm、副波長546nmであり、温度37℃で測定を実施した。

【0024】

(1) 酵素試液

グッド緩衝液	pH5.5~7.5	100 mM
不活性化型 α -アミラーゼ(ブタ膵臓由来)		10 IU/ml
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
α -シクロデキストリン		1.5 mM

(2) 基質試液

グッド緩衝液	pH5.5~7.5	100 mM
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシド		0.8 mM

【0025】実施例2

下記の酵素試液および基質試液の両試液のpHを5.5~7.5の範囲で変えて、塩素イオン測定試薬を調製し、精製水、塩化ナトリウム100mM標準液を試料とした。試料5.8 μ lに酵素試液180 μ l加え、5分間予備加温した後、さらに、基質試液90 μ lを加えて反応を開始させ、該基質試液添加後、2分後からの3分*

※間における1分あたりの吸光度変化を求め、塩素イオン100mMの感度(mABS/min)を求めた。その結果を図1に示す。

【0026】なお、測定装置は日立7170形自動分析装置を使用し、測定波長は、主波長405nm、副波長546nmであり、温度37℃で測定を実施した。

【0027】

(1) 酵素試液

(5)

特開平11-266898

7		8
グッド緩衝液	pH5.5~7.5	100 mM
不活性化型 α -アミラーゼ(ブタ膵臓由来)		10 IU/ml
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
α -シクロデキストリン		1.5 mM

(2) 基質試液

グッド緩衝液	pH5.5~7.5	100 mM
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
2-クロロ-4-ニトロフェニル		
α -マルトトリオシド		0.8 mM

【0028】比較例1

下記の酵素試液および基質試液の両試液のpHを5.5~7.5の範囲で変えて、塩素イオン測定試薬を調製し、精製水、塩化ナトリウム100mM標準液を試料とした。試料5.8 μ lに酵素試液180 μ l加え、5分間予備加温した後、さらに基質試液90 μ lを加えて反応を開始させ、該基質試液添加後、2分後からの3分間*

*における1分あたりの吸光度変化を求め、塩素イオン100mMの感度(mABS/min)を求めた。その結果を図1に示す。

【0029】なお、測定装置は日立7170形自動分析装置を使用し、測定波長は、主波長405nm、副波長546nmであり、温度37℃で測定を実施した。

【0030】

(1) 酵素試液

グッド緩衝液	pH5.5~7.5	100 mM
不活性化型 α -アミラーゼ(ブタ膵臓由来)		10 IU/ml
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
α -シクロデキストリン		1.5 mM

(2) 基質試液

グッド緩衝液	pH5.5~7.5	100 mM
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
4-ニトロフェニル α -D-マルトトリオシド		0.8 mM

【0031】図1から明らかなように、比較例1に比べ、実施例1、2の相対感度が、顕著に向上していることがわかる。

【0032】実施例3

下記の酵素試液および基質試液にマルトースを0~100mMの範囲で濃度を変えて、塩素イオン測定試薬を調製し、精製水、塩化ナトリウム100mM標準液を試料とした。試料5.8 μ lに酵素試液180 μ l加え、5分間予備加温した後、さらに基質試液90 μ lを加えて*

30*反応を開始させ、該基質試液添加後、2分後からの3分間における1分あたりの吸光度変化を求め、塩素イオン100mMの感度(mABS/min)を求めた。その結果を図2に示す。

【0033】なお、測定装置は日立7170形自動分析装置を使用し、測定波長は、主波長405nm、副波長546nmであり、温度37℃で測定を実施した。

【0034】

(1) 酵素試液

グッド緩衝液	pH6.0	100 mM
不活性化型 α -アミラーゼ(ブタ膵臓由来)		10 IU/ml
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
α -シクロデキストリン		1.5 mM
マルトース		0~100 mM

(2) 基質試液

グッド緩衝液	pH6.0	100 mM
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
マルトース		0~100 mM

2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O-β

-D-ガラクトピラノシル-α-マルトシド 0.8 mM

【0035】図2から明らかなように、マルトースの添加により、目的に応じて感度を調節できることがわかる。

【0036】実施例4

下記の酵素試液および基質試液に、マルトースを0～100mMの範囲で濃度を変えて、塩素イオン測定試薬を調製し、塩化ナトリウム100mM水溶液およびマルトース2g/dlの塩化ナトリウム100mM水溶液を試料とした。試料5.8μlに酵素試液180μl加え、5分間予備加温した後、さらに基質試液90μlを加え*

*て反応を開始させ、該基質試液添加後、2分後から3分間における1分あたりの吸光度変化を求め、精製水および塩素イオン100mM標準液での2点検量線に基づき、試料中の塩素イオン量を求めた。その結果を表1に示す。

【0037】なお、測定装置は日立7170形自動分析装置を使用し、測定波長は、主波長405nm、副波長546nmであり、温度37℃で測定を実施した。

【0038】

(1) 酵素試液

グッド緩衝液	pH6.0	100 mM
不活性化型α-アミラーゼ(ブタ膵臓由来)		10 IU/ml
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
α-シクロデキストリン		1.5 mM
マルトース		0～100 mM

(2) 基質試液

グッド緩衝液	pH6.0	100 mM
EDTA		200 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル		0.05 %
マルトース		0～100 mM
2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O-β		
-D-ガラクトピラノシル-α-マルトシド		0.8 mM

【0039】

※ ※【表1】

試料中の マルトース濃度(g/dl)	測定試液中のマルトース濃度(mM)					
	0	2.5	12.5	25	50	100
0	101.3	103.5	102.8	103.8	102.1	101.9
2	357.1	118.6	104.5	103.4	103.4	100.8
影響度 (%)	252.5	14.6	1.7	-0.4	1.3	-1.1

【0040】表1から明らかなように、マルトースの添加により、試料中の内因性マルトースの影響が軽減、回避することができることがわかる。

【0041】

【発明の効果】本発明の塩素イオン測定用組成物は、追随酵素が不要であり、また、高感度であることから、精密性、定量性、正確性に優れた塩素イオンの酵素的測定用組成物を提供できる。

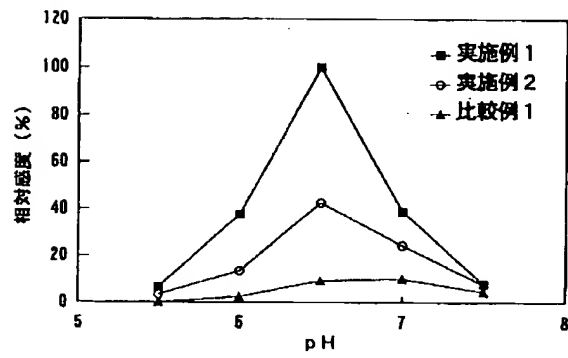
【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1、2および比較例1の試薬におけ ☆

☆る、塩素イオン100mMの感度(mABS/min)を示す図である。縦軸を実施例1の試薬(pH6.5)を100%としたときの相対感度(%)、横軸をpH値として示す。

【図2】 実施例3のマルトース濃度を変えて調製した試薬における、塩素イオン100mMの感度(mABS/min)を示す図である。縦軸にマルトース無添加時を100%とした相対感度(%)、横軸を添加マルトース濃度(g/L)として示す。

【図1】



【図2】

